





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکترای حرفه ای (پزشکی)

موضوع:

بررسی کارایی سه روش مختلف استخراج DNA

بروسلا از سرم به روش PCR

استاد راهنما:

دکتر هادی پیری دوگانه

استاد مشاور:

دکتر فرهاد پورفرضی

نگارش:

زهرا ولی نژاد

پائیز ۸۹

شماره پایان نامه:

۰۳۵۳

خداوندا

سپاست می گویم که مرا یاری نمودی تا این مسیر دشوار را بپیمایم، زین پس بیش از پیش به لطف و یاری ات نیازمندم، تا التیام بخش گوشه ای از آلام عزیزانی باشم که به بهای رنج هایشان طبابت را آموختم...

تقدیم به ساحت نورانی و مقدس چهارده معصوم علیهم السلام

مولای عشق، حضرت امام حسین علیه السلام

وشهدای مظلوم و اسرای صبور عرصه ی نینوا

و تقدیم به مولای عصر، صاحب اختیار و هستی ام، حضرت امام مهدی عجل... تعالی فرجه الشریف

تقدیم به مادر عزیزم

صبورترین الهه ی هستی، آرامش بخش لحظه لحظه ی زندگی ام

پدر عزیزم

بزرگ مرد آسمان زندگی ام

برادرانم عباس، حسین و مهدی و خواهرانم معصومه و فاطمه (و خانواده ی محترمشان)

همراهان همیشگی و ستون های استوار زندگی ام

تقدیم به دوست همچون خواهرم، همراه و سنگ صبور و آرامش بخش روزهای سخت دوران تحصیل

سرکار خانم دکتر راحله عسگری مقدم

تقدیم به دوستان عزیزم

سرکار خانم دکتر ندا حبیبی

که شیرینی و آرامش روزهای سخت پایان تحصیل را مدیون همراهی و حضور بی دریغ اویم

و سرکار خانم ها دکتر امینه منافی، دکتر بهنور حنفی زاده، دکتر هانیه نیک پو، دکتر ندا پرستار، دکتر الهام ملکی

فرد

و سرکار خانم ها منیره بایرامی، ناهید نساجی، سمیرا نصیری

و سرکار خانم ها ویدا آقازاده و آسیه فتحی

که گل واژه های سپاس و تقدیر با تمام زیبایی تقدیمشان باد

سپاس و تقدیم بی پایان از زحمات استاد بزرگوار و ارجمندم

جناب آقای دکتر هادی پیری دوگاهه

که همواره با راهنماییهای دلسوزانه و وجود پرمهرشان یاریگرم بودند

و تشکر و تقدیر ویژه از استاد بزرگوار و وارسته ام

جناب آقای دکتر سید سعید حسینی اصل

که با همراهی و لطف بی دریغ خود، راهگشا و حامی من در تحمل سختی های این مسیر بودند

و با تشکر و تقدیر از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر فرهاد پورفرضی

و

تقدیم به تمام بزرگوارانی که علاوه بر طب، علم چگونه زیستن را نیز به من آموختند

به ویژه جناب آقای دکتر صالح زاده، جناب آقای دکتر ادیانی

جناب آقای دکتر فتاحی، جناب آقای دکتر ایماشی و سرکار خانم دکتر مشتاقیان

و

تقدیم به تمام عزیزانی که طبابت را بر بالین آنان آموختم

و تمام آنانی که چشم امید به آموخته هایم دارند...

مقایسه سه روش مختلف استخراج DNA جهت ردیابی DNA بروسلا در نمونه های سرم انسان

چکیده:

سابقه و هدف: بروسلاز انسانی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران، یک مشکل اساسی بهداشت جامعه می باشد. تابلوی بالینی بروسلاز بسیار غیر اختصاصی بوده و تشخیص آن به تائید آزمایشگاهی نیازمند می باشد. کشت خون معیار طلایی جهت تشخیص بیماری می باشد با این وجود حساسیت این روش کم می باشد. از طرف دیگر، تست های سرولوژیک در مناطق اندمیک بیماری از حساسیت مناسبی برخوردار نیستند. ابداع روش های جدید تشخیصی که دارای حساسیت بالایی باشند و خطر عفونت در پرسنل آزمایشگاه را به حد اقل برسانند، از اهمیت زیادی برخوردار شده اند. واکنش زنجیره ای پلی مراز از جمله روش هایی است که این مزایا را دارا می باشد. ما در این مطالعه، به مقایسه سه روش مختلف ردیابی نسبی DNA باکتری بروسلا در سرم پرداختیم.

مواد و روشها: نمونه های سرم انسان بطور مصنوعی با غلظت های مشخصی از باکتری بروسلا تلقیح شدند. DNA با سه روش استخراج شد و با PCR اختصاصی جنس بروسلا مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته ها: یافته های ما نشان داد که پروتکل کیت سیناژن در مقایسه با دو روش دیگر در رقت های پایین تری از DNA بروسلا قادر به ردیابی DNA این باکتری در سرم می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه کیت سیناژن روش ارجح در استخراج بوده و دارای حساسیت بهتر برای جداسازی DNA بروسلا از نمونه های سرم می باشد.

واژه های کلیدی: PCR، استخراج DNA، بروسلاز

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
فصل اول: طرح تحقیق	
۱-۱	بیان مسأله و ضرورت انجام تحقیق ----- ۲
۱-۲	تعریف واژه‌های کلیدی ----- ۴
۱-۳	اهداف طرح ----- ۵
۱-۳-۱	هدف کلی ----- ۵
۱-۳-۲	اهداف اختصاصی ----- ۵
۱-۳-۳	اهداف کاربردی ----- ۵
فصل دوم: بررسی متون و مقالات	
۲	بررسی متون و مقالات ----- ۷
۲-۱	اپیدمیولوژی ----- ۷
۲-۲	تاریخچه ----- ۱۰
۲-۳	جنس بروسلا ----- ۱۲
۲-۴	ژنتیک مولکولی (Molecular Genetics) ----- ۱۴
۲-۵	سایر عفونتهای بروسلائی ----- ۱۵
۲-۵-۱	عفونت دستگاه گوارشی ----- ۱۵
۲-۵-۲	عفونت کبد و صفرا ----- ۱۵
۲-۵-۳	عفونت استخوان ----- ۱۶
۲-۵-۴	عفونت دستگاه عصبی ----- ۱۷
۲-۵-۵	عفونت های قلبی - عروقی ----- ۱۷
۲-۵-۶	عفونت دستگاه تنفسی ----- ۱۸
۲-۵-۷	عفونت دستگاه ادراری - تناسلی ----- ۱۸
۲-۶	حاملگی ----- ۱۸
۲-۷	عوارض هماتولوژیک ----- ۱۹
۲-۸	ضایعات پوستی ----- ۱۹
۲-۹	ضایعات چشمی ----- ۲۰
۲-۱۰	پاتوژنز ----- ۲۰
۲-۱۱	ایمنی میزبان ----- ۲۱

- ۲۲-۱۲-۲-روشهای تشخیص ----- ۲۲
- ۲۲-۱۲-۱-نقش کشت خون در تشخیص بروسلاز انسانی ----- ۲۲
- ۲۶-۱۳-۲-جنبه‌های متدولوژی (Methodological aspects) ----- ۲۶
- ۲۶-۱۳-۱-آماده سازی نمونه (Sample preparation) ----- ۲۶
- ۲۷-۱۳-۲-انتخاب توالی هدف (Target sequence selection) ----- ۲۷
- ۲۷-۱۳-۳-ردیابی محصولات PCR (Detection of PCR product) ----- ۲۷
- ۲۸-۱۳-۴-شناسایی بروسلا در سطح گونه ----- ۲۸
- ۳۰-۱۳-۵-شناسایی بروسلا توسط PCR با استفاده از نمونه‌های بالینی ----- ۳۰
- ۳۲-۱۴-۲-تشخیص سرولوژی ----- ۳۲
- ۳۳-۱۴-۱-آزمایش روز بنگال ----- ۳۳
- ۳۴-۱۴-۲-آگلوتیناسیون استاندارد لوله ای ----- ۳۴
- ۳۵-۱۴-۳-آزمایش ۲-مرکاپتواتانول ----- ۳۵
- ۳۵-۱۴-۴-آزمایش کومبس رایت ----- ۳۵
- ۳۶-۱۴-۵-آزمایش الیزا ----- ۳۶
- ۳۷-۱۵-۲-تشخیص بروسلاز به روش PCR ----- ۳۷
- ۳۸-۱۶-۲-درمان ----- ۳۸

فصل سوم: مواد و روشها

- ۴۱-۳-۱-نوع مطالعه ----- ۴۱
- ۴۱-۳-۲-مراحل انجام کار ----- ۴۱
- ۴۱-۳-۲-۱-استخراج DNA بروسلا به روش ساده ----- ۴۱
- ۴۲-۳-۲-۲-شرایط Set up واکنش های PCR در دستگاه ترمو سایکلر برای پرایمر های B₄/B₅ و F₄/R₂ ----- ۴۲
- ۴۲-۳-۲-۳-استخراج DNA ژنومی از کشت باکتریائی و تهیه رقت های مختلف DNA در ----- ۴۲
- ۴۴-۳-۲-۴-۱-سرمد با استفاده از روش سریال دایلوژن ----- ۴۴
- ۴۴-۳-۲-۴-۲-استخراج DNA از سرم های رقیق شده با روشهای ۱ و ۲ و ۳ ----- ۴۴
- ۴۴-۳-۲-۴-۳-استخراج DNA از سرم با کیت شرکت سیناژن ----- ۴۴
- ۴۶-۳-۲-۴-۴-تهیه ی DNA با لیز کردن و جوشاندن باکتریهای جدا شده از سرم ----- ۴۶
- ۴۶-۳-۲-۴-۵-تهیه ی DNA با استفاده از SV Gel system (کیت شرکت Promega) ----- ۴۶
- ۴۷-۵-۲-۳-انجام عمل PCR بر روی نمونه ها ----- ۴۷
- ۴۷-۱-۵-۲-۳-آماده سازی واکنش های PCR ----- ۴۷
- ۴۹-۳-۲-۵-۲-الکتروفورز محصولات PCR ----- ۴۹

فصل چهارم: نتایج

۱-۴-نتایج ----- ۵۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۱-۵-بحث و نتیجه گیری ----- ۵۷

۲-۵-پیشنهادهات ----- ۶۰

منابع ----- ۶۱

چکیده انگلیسی ----- ۷۲

فهرست جداول

صفحه

عنوان

جدول ۱-۳- شرایط Set up واکنش های PCR در دستگاه ترمو سایکلر برای پرایمر های

۴۳----- B_4/B_5 و F_4/R_2

جدول ۲-۳- مواد Master Mix 1.5 ----- ۴۸

جدول ۳-۳- مواد مورد نیاز جهت هر نمونه ی PCR ----- ۴۸

جدول ۱-۴- نتایج آزمایش PCR با غلظت های مختلف DNA خالص باکتری در سرم

که به وسیله ی رقیق سازی سریال آماده شده اند ----- ۵۳

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

شکل ۴-۱- نتایج حاصل از PCR با غلظت های مختلف DNA محلول در سرم با استفاده از

پرایمر B_4/B_5 ----- ۵۲

شکل ۴-۲- Set up پرایمرهای F_4/R_2 برای بروسلا ملی تنسیس ----- ۵۴

شکل ۴-۳- نتایج حاصل از PCR روی ۱۰ نمونه ی استخراج شده با روش Boiling با

پرایمر F_4/R_2 ----- ۵۵

bp: base pair

CSF:cerebrospinal fluid

DNA:deoxyribonucleic acid

EDTA:ethylenediaminetetraacetic acid

IFN:interferon

Ig: Immunoglobulin

LPS:lipopolysaccharide

M.M: master mix

NK cell:natural killer cell

PMN:poly morphonuclear

PCR:polymerase chain reaction

rRNA:ribosomal ribonucleic acid

SAT:standard agglutination test

SPA:serum plate agglutination

Th:T-lymphocyte helper

TNF:tumor necrotizing factor

2ME:2mercaptoethanol

WHO: world Healthy Organization

فصل اول

کلیات

۱-۱- بیان مسأله و ضرورت انجام تحقیق

بروسلوز انسانی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران یک مشکل اساسی بهداشت جامعه می باشد. در اغلب موارد تشخیص برسلوز دشوار است و دلیل این دشواری نه فقط به خاطر شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماریهای عفونی و غیر عفونی می باشد بلکه همچنین روشهای تشخیصی در اغلب موارد موفق به جداسازی ارگانیزم نمی گردند. (۱،۲) سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز را در هر سال ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است، و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلوز انسانی می باشد. (۳)

علائم بالینی این بیماری فوق العاده غیراختصاصی است و تظاهرات بسیار متغیر را شامل می شود. تظاهرات بیماری به صورت یک سندرم تب دار همراه با علائم سیستمیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی اشتهایی و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاریهایی مثل آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، مننژیت، اپیدیدیموارکیت و بروز می کند. از آنجایی که تظاهرات بالینی بروسلوز انسانی بسیار متغیر می باشد، تشخیص بیماری عمدتاً با استفاده از روش های آزمایشگاهی انجام می شود. (۴)

کشت خون معیار طلایی (Gold standard) تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز می باشد. خون محیطی نمونه بالینی است که در اغلب موارد جهت جداسازی گونه های بروسلا به کار می رود. در اشکال حاد بیماری که توسط بروسلا ملی تنسیس ایجاد می شود، تعداد موارد مثبت کشت خون معمولاً بالاست و در ۷۰-۸۰ درصد کشت خون مثبت می گردد. با وجود این، تعداد کشت خون مثبت در مواردی که بیماران برای مدت طولانی دچار بیماری و یا دچار عوارض موضعی بیماری از قبیل (مننژیت، آندوکاردیت، اسپوندیلیت و غیره) می باشند و یا عامل ایجاد کننده بیماری بروسلا آبورتوس یا بروسلا کانیس باشد، بطور قابل ملاحظه ای کاهش می یابد و بندرت بیش از ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد را شامل می گردد. (۵) براساس سیستم های کشت